

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-520484

(P2021-520484A)

(43) 公表日 令和3年8月19日 (2021.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2020-554068 (P2020-554068) (86) (22) 出願日 平成31年4月2日 (2019.4.2) (85) 翻訳文提出日 令和2年10月28日 (2020.10.28) (86) 国際出願番号 PCT/EP2019/058224 (87) 国際公開番号 W02019/192978 (87) 国際公開日 令和1年10月10日 (2019.10.10) (31) 優先権主張番号 18165380.9 (32) 優先日 平成30年4月3日 (2018.4.3) (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 504456798 サノファイ S A N O F I フランス国、エフ - 7 5 0 0 8 ・ パリ、リ ュ・ラ・ボエティ・5 4 5 4 r u e L a B o ▲ e ▼ t i e , F - 7 5 0 0 8 P a r i s , F r a n c e (74) 代理人 100091487 弁理士 中村 行孝 (74) 代理人 100105153 弁理士 朝倉 悟 (74) 代理人 100120617 弁理士 浅野 真理 最終頁に続く
---	--

(54) 【発明の名称】 ラテラルフロー免疫アッセイストリップ装置

(57) 【要約】

本発明は、液体サンプル中の標的ペプチドを検出するためのラテラルフローアッセイ装置であって、(a) 固体支持体、(b) 前記固体支持体の第1の端部でサンプルを最初に受容し、任意に前処理するためのサンプルパッド、(c) 前記固体支持体の第2の端部の吸収パッド、(d) 乾燥状態で粒子と前記標的ペプチドとの可動性コンジュゲートを含むコンジュゲートパッドであって、前記粒子にコンジュゲートされた標的ペプチドはビオチン化され、該粒子はその表面にビオチン結合タンパク質を含み、(e) 以下を含む標的ペプチド反応膜、(i) 前記標的ペプチドに対する固定化された第1の捕捉試薬を含む捕捉領域、および (i i) 任意に、粒子対照コンジュゲートに対する固定化された第2の補足試薬を含む対照領域を含み、前記サンプルパッド、コンジュゲートパッド、反応膜および吸収パッドは前記固体支持体に取り付けられて、前記サンプルパッドから前記コンジュゲートパッドを介した前記反応膜への毛細管流動を可能にし、前記標的ペプチドによる粒子の充填は、前記粒子の最大充填容量の約20%～約55%である、前記ラテラルフローアッセイ装置に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体サンプル中の標的ペプチドを検出するためのラテラルフローアッセイ装置であって、

、

(a) 固体支持体、

(b) 前記固体支持体の第 1 の端部でサンプルを最初に受容し、任意に前処理するためのサンプルパッド、

(c) 前記固体支持体の第 2 の端部の吸収パッド、

(d) 乾燥状態で粒子と前記標的ペプチドとの可動性コンジュゲートを含むコンジュゲートパッドであって、前記粒子にコンジュゲートされた標的ペプチドはビオチン化され、
該粒子はその表面にビオチン結合タンパク質を含み、

(e) 以下を含む標的ペプチド反応膜

(i) 前記標的ペプチドに対する固定化された第 1 の捕捉試薬を含む捕捉領域、および

(i i) 任意に、粒子対照コンジュゲートに対する固定化された第 2 の捕捉試薬を含む対照領域

を含み、

前記サンプルパッド、コンジュゲートパッド、反応膜および吸収パッドは前記固体支持体に取り付けられて、前記サンプルパッドから前記コンジュゲートパッドを介した前記反応膜への毛細管流動を可能にし、

前記標的ペプチドによる粒子の充填は、前記粒子の最大充填容量の約 20 %～約 55 % である、前記ラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 2】

前記装置がストリップ装置、特に免疫クロマトグラフィーストリップ装置である、請求項 1 に記載のラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 3】

前記粒子が、金コロイドナノ粒子、着色ラテックスビーズ、磁性粒子、カーボンナノ粒子、セレンナノ粒子、銀ナノ粒子および量子ドットからなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載のラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 4】

前記粒子が金コロイドナノ粒子である、請求項 3 に記載のラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 5】

前記粒子が実質的に球形であり、直径が 10～100 nm、有利には 20～60 nm、最も有利には 40 nm である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 6】

前記ビオチン結合タンパク質が、アビジン、ストレプトアビジンおよび脱グリコシル化アビジンからなる群から選択される、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 7】

前記脱グリコシル化アビジンがニュートラアビジンである、請求項 6 に記載のラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 8】

前記標的ペプチドによる前記粒子の充填が、前記粒子の最大充填容量の約 20 %～約 35 % である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載のラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 9】

前記粒子がその表面上にウシ血清アルブミン (BSA) をさらに含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載のラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 10】

前記液体サンプルが、尿、血漿血清、全血、汗および唾液からなる群から選択される体液であり、典型的には尿である、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 1 1】

前記標的ペプチドが C 末端架橋テロペプチド I I 型コラーゲン (C T X - I I) である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載のラテラルフローアッセイ装置。

【請求項 1 2】

液体サンプル中の標的ペプチドの検出、有利には定量的検出のための方法であって、

(a) 請求項 1～11 のいずれか一項に記載の装置のサンプルパッドに前記液体サンプルを適用して、前記サンプルパッドからコンジュゲートパッドを介して反応膜へのサンプルの流れを可能にする工程、

(b) 捕捉領域においてコンジュゲートの存在または量を検出する工程、および

(c) 任意に、対照領域において対照コンジュゲートの存在または量を検出する工程を含み、

前記捕捉領域におけるコンジュゲートの存在もしくは不存在または検出量は、それぞれ前記液体サンプル中の標的ペプチドの不存在もしくは存在または量を示す、前記方法。

【請求項 1 3】

液体サンプル中の標的ペプチドの定量化のための、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の装置の使用。

【請求項 1 4】

疾患または健康状態の診断または予後診断のための、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の装置の使用。

【請求項 1 5】

対象、典型的には変形性関節症を有する対象における軟骨劣化を判断するための、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の装置の使用。

【請求項 1 6】

疾患または健康状態を診断または予後診断する方法であって、

(a) 請求項 1～11 のいずれか一項に記載の装置のサンプルパッドに液体サンプルまたは希釈液体サンプルを適用して、前記サンプルパッドからコンジュゲートパッドを介して反応膜へのサンプルの流れを可能にする工程、

(b) 捕捉領域においてコンジュゲートの存在または量を検出する工程、および

(c) 任意に、対照領域において対照コンジュゲートの存在または量を検出する工程を含み、

前記捕捉領域におけるコンジュゲートの存在もしくは不存在または検出量は、それぞれ前記液体サンプル中の標的ペプチドの不存在もしくは存在または量を示し、

前記液体サンプル中の標的ペプチドの不存在もしくは存在または量を、前記疾患または健康状態の診断または予後診断の指標とする、前記方法。

【請求項 1 7】

前記疾患が変形性関節症であり、前記標的ペプチドが C T X - I I である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

追加の工程、

(d) 所定の閾値を超える C T X - I I の存在がサンプル中に検出された場合、またはサンプル中の C T X - I I の量が前記サンプルにおける所定の閾値を超える場合、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容可能な塩もしくは誘導体、例えばヒラン G - F 2 0 を含む関節内補充薬を前記対象に処方する工程

を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

追加の工程、

(d) 所定の閾値を超える C T X - I I の存在がサンプル中に検出された場合、ヒアル

10

20

30

40

50

ロン酸またはその薬学的に許容可能な塩もしくは誘導体、例えばヒラン G-F 20 を含む関節内補充薬を前記対象に投与する工程を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

対象における変形性関節症等の軟骨疾患に関連する疼痛の治療における使用のための、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容可能な塩もしくは誘導体、例えばヒラン G-F 20 を含む関節内補充薬であって、前記対象の尿サンプル中の CTX-I I の濃度が請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のラテラルフローアッセイ装置を使用して測定され、前記尿サンプル中の CTX-I I の濃度に応じて、関節内補充薬が前記対象に投与される、前記関節内補充薬。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、診断方法および装置の分野に関し、特にラテラルフロー免疫アッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

ラテラルフローアッセイ (LFA) は、ユーザーフレンドリーで、比較的安価で高速な診断アッセイの特定の形式である。それらは、例えば、診療現場での診断において使用することができ、生物学的サンプル、環境サンプルまたは食品サンプル中のポリペプチドおよび核酸等の分析物の定性的または定量的検出を提供する。

20

【0003】

ラテラルフローアッセイは、血液や尿等のサンプルの成分が毛細管力によって反応膜に輸送されるクロマトグラフィーシステムで構成されている。免疫化学反応（すなわち、抗体-抗原）は、しばしば検出に使用される。サンプルは毛細管力によって膜を横切って移動する。標準的なラテラルフローアッセイには、少なくとも次の 4 つの部分を含む：サンプルパッド、すなわち液体サンプルが適用される領域；捕捉試薬（例えば、抗体）と組み合わせた標識タグを含むコンジュゲートパッド；標的抗原-抗体相互作用のための試験ラインおよび対照ラインを含む反応膜（通常はニトロセルロース膜）；および残存するサンプルを保存する吸収パッド（総説として、Bahadir & Sezginurk, Trends in Analytical Chemistry (2016) 82, 286-306; Sajid et al., J. Saudi Chem. Soc. (2015) 19, 689-705; Koczula & Gallotta, Essays in Biochemistry (2016) 60, 111-120 を参照されたい）。

30

【0004】

LFA の典型的な構成としては、検出される分析物に対する 2 つの異なる抗体を利用するサンドイッチ免疫アッセイと、サンプル内の標識化されていない分析物分子と競合する標識化された分析物分子を含む競合免疫アッセイが挙げられる。この目的で使用される標的としては、金またはカーボンナノ粒子等のナノ粒子およびラテックスビーズが挙げられる。

【0005】

ラテラルフローアッセイは、細菌抗原（例えば、WO 2014/059274 A1、WO 99/05524 A1 を参照された）、および心臓トロポニン I、ミオグロビン等のタンパク質バイオマーカー（例えば、Zhu et al., Clinical Chemistry (2011) 57:12, 1732-1738 を参照されたい）、およびコラーゲンテロペプチド（例えば、Lee et al., Sensors (2013) 13, 165-174 を参照されたい）。

40

【0006】

コラーゲンの N 末端および C 末端テロペプチド（それぞれ NTX および CTX）は、骨代謝回転のマーカーである（Lee et al., loc. cit.）。コラーゲンタイプ I I のヒト C 末端架橋テロペプチドである CTX-I I は、例えば、変形性関節症（OA）および関節リウマチ（RA）等の関節疾患における軟骨劣化のマーカーであることが知られている

50

(Christgau et al., Bone (2001) 29(3):209-15 ; Garnero et al., Ann. Rheum. Dis. (2001) 60:619-626 ; Mouritzen et al., Ann. Rheum. Dis. (2003) 62:332-336) 。

【0007】

C T X - I I を検出するための免疫アッセイは市販されており、例えば、L i f e S p a n B i o s c i e n c e s 社（シアトル、ワシントン州、米国）からの競合 E I A およびサンドイッチ E L I S A キットが挙げられる。

【0008】

しかしながら、利用可能なアッセイは感度が比較的低いか、かつ／または診療現場（P O C）で使用することができない。

【発明の概要】

【0009】

本発明によれば、高感度、高ダイナミックレンジで、患者が来院する診療所等の診療現場において使用することができるラテラルフロー免疫アッセイの方法および装置が提供される。これは、検査が医療研究所に限定され、検体を診療現場から送り出し、結果を得るために数時間または数日待つ必要があり、その間、必要な情報がない状態で診療を継続しなければならないか、または結果が得られるまで診療が中断される当技術分野において利用可能な方法とは対照的である。

【0010】

特に、本発明は、液体サンプル中の標的ペプチドを検出するためのラテラルフローアッセイ装置であって：

（a）固体支持体、

（b）前記固体支持体の第1の端部でサンプルを最初に受容し、任意に前処理するためのサンプルパッド、

（c）前記固体支持体の第2の端部の吸収パッド、

（d）乾燥状態で粒子と前記標的ペプチドとの可動性コンジュゲートを含むコンジュゲートパッドであって、前記粒子にコンジュゲートされた標的ペプチドがビオチン化され、該粒子がその表面にビオチン結合タンパク質を含むコンジュゲートパッド、

（e）以下を含む標的ペプチド反応膜

（i）前記標的ペプチドに対する固定化された第1の捕捉試薬を含む捕捉領域、および

（i i）任意に、対照コンジュゲートに対する固定化された第2の捕捉試薬を含む対照領域を含み、

前記サンプルパッド、コンジュゲートパッド、反応膜および吸収パッドが前記固体支持体に取り付けられて、前記サンプルパッドから前記コンジュゲートパッドを介した前記反応膜への毛細管流動を可能にする前記装置に関する。

【0011】

本明細書において有利なことに、前記標的ペプチドによる粒子の充填は、前記粒子の最大充填容量の約20%～約55%である。

【0012】

本発明の装置は、免疫アッセイにおいて使用するための免疫クロマトグラフィー装置であり、有利にはストリップ形式である。本発明の装置は、特に、液体サンプル中の標的ペプチドの定量的検出に使用することができる。

【0013】

本発明によれば、さらに、液体サンプル中の標的ペプチドの検出、特に定量的検出のための方法であって、

（a）本発明の装置のサンプルパッドに前記液体サンプルを適用して、前記サンプルパッドからコンジュゲートパッドを介して反応膜へのサンプルの流れを可能にする工程、

（b）捕捉領域においてコンジュゲートの存在または量を検出する工程、および

（c）任意に、対照領域において対照コンジュゲートの存在または量を検出する工程

10

20

30

40

50

を含み、

前記捕捉領域におけるコンジュゲートの存在もしくは不存在または検出量が、それぞれ前記液体サンプル中の標的ペプチドの不存在もしくは存在または量を示す前記方法に関する。

【0014】

具体的な態様において、本発明の装置および方法は、CTX-I Iの検出に使用される。本発明の装置および方法は、診断および予後診断の方法、ならびに対象を層別化するための方法および／または治療モニタリング中に使用することができる。CTX-I Iの検出の場合、本発明の装置および方法は、例えば、変形性関節症の患者を診断または予後診断するために使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、本発明のラテラルフロー免疫アッセイの例示的な構成を示す。1：サンプル；10：固体支持体；11：サンプルパッド；12：コンジュゲートパッド；13：吸収パッド；20：反応膜；21：試験ライン；22：対照ライン。

【図2】図2は、本発明の競合LFAの例示的かつ典型的な構成および経過を示す。A：試験開始前；B：陰性試験；C：陽性試験；1：サンプル；12：コンジュゲートパッド；21：試験ライン；22：対照ライン。

【図3】図3は、CTX-I Iが50%充填されている本発明のコンジュゲートを示す。

【図4】図4は、粒子における異なる充填率（10%、30%、50%、100%）のCTX-I Iにおける試験ラインの強度、およびサンプル中の異なる濃度のCTX-I Iにおける試験ラインの強度を示す。

【図5】図5は、サンプル中の異なるCTX-I I濃度、およびコンジュゲートの異なるCTX-I I充填率（対数目盛）についての単位の強度（リーダーによって読み取られたもの）を示す。

【発明の詳細な説明】

【0016】

本発明は、液体サンプル、特に尿または血液等の生物学的サンプル中のペプチド分析物（オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質）を検出するためのラテラルフローアッセイ装置、特にストリップ形式のラテラルフローアッセイ装置に関する。前記アッセイは、標的ペプチドにコンジュゲートした検出可能な粒子を使用する競合免疫アッセイである。前記コンジュゲートにおいて、標的ペプチドはビオチン化され、粒子はその表面にビオチン結合タンパク質を含み、その結果、標的ペプチドのビオチン部分がビオチンとビオチン結合タンパク質との相互作用を介して粒子に結合される。好適な粒子としては、例えば、金ナノ粒子が挙げられ、好適なビオチン結合タンパク質としては、ニュートラアビジン、ストレプトアビジンおよびアビジンが挙げられる。

【0017】

本発明は、液体サンプル中の標的ペプチドを検出するためのラテラルフローアッセイ装置であって、

（a）固体支持体、

（b）前記固体支持体の第1の端部でサンプルを最初に受容し、任意に前処理するためのサンプルパッド、

（c）前記固体支持体の第2の端部の吸収パッド、

（d）乾燥状態で粒子と前記標的ペプチドとの可動性コンジュゲートを含むコンジュゲートパッドであって、前記粒子にコンジュゲートされた標的ペプチドがビオチン化され、該粒子がその表面にビオチン結合タンパク質を含むコンジュゲートパッド、

（e）以下を含む標的ペプチド反応膜

（i）前記標的ペプチドに対する固定化された第1の捕捉試薬を含む捕捉領域、および

（ii）任意に、対照コンジュゲートに対する固定化された第2の捕捉試薬を含む対

10

20

30

40

50

照領域

を含み、

前記サンプルパッド、コンジュゲートパッド、反応膜および吸収パッドが前記固体支持体に取り付けられて、前記サンプルパッドから前記コンジュゲートパッドを介した前記反応膜への毛細管流動を可能にする前記装置に関する。

【0018】

本発明の装置において、標的ペプチドによる粒子の充填は、有利には、粒子の最大充填容量の約20%～約55%である。

【0019】

本発明の装置は、免疫アッセイにおいて使用するための装置であり、有利にはストリップ形式である。特に、本発明の装置は、液体サンプル中の標的ペプチドの定量的検出に使用することができる。試験領域および対照領域（存在する場合）は、通常、ラインの形態をとる。したがって、本明細書では、それらはそれぞれ「試験ライン」および「対照ライン」と呼ばれることもある。

【0020】

「対照コンジュゲート」は、例えば、金ナノ粒子等の粒子と、対照領域に結合する対照ペプチドとのコンジュゲートであり得る。対照ペプチドは、有利には、粒子に非共有結合（「コンジュゲート」）され得る。対照領域は、捕捉試薬、例えば、前記対照ペプチドに対する抗体またはその抗原結合断片、または前記対照ペプチドに結合することができる結合タンパク質を含む。本明細書において、有利には、対照ペプチドはビオチン化対照ペプチドであり、対照領域はニュートラアビジン等のビオチン結合タンパク質を含む。例示的な対照ペプチドは、有利にビオチン化されるウシ血清アルブミン（BSA）である。対照ペプチドは、検出されるサンプル中に通常は存在しないことが有利である。対照コンジュゲート（存在する場合）は、標的ペプチドのコンジュゲート（「標的コンジュゲート」または「標的ペプチドコンジュゲート」）としてコンジュゲートパッド上に存在する。標的ペプチドコンジュゲートおよび対照ペプチドコンジュゲートは、例えば、装置のコンジュゲートパッドに添加する前に混合することができる。したがって、特定の対照コンジュゲートは、金コロイドナノ粒子等のナノ粒子およびBSA等のビオチン化対照ペプチドを含む。

【0021】

本発明の文脈において「ペプチド」は、ペプチド（アミド）結合によって連結されたアミノ酸モノマーの鎖である。本明細書において「ペプチド」という用語は、オリゴペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を包含する。

【0022】

本発明の文脈において「オリゴペプチド」は、アミド結合によって一緒に保持された典型的には2～9個のアミノ酸残基の単一の（典型的には）直鎖である。本発明の文脈において「ポリペプチド」は、アミド結合によって一緒に保持された、多くの（典型的には10以上、特に10～約100）アミノ酸残基の単一の（典型的には）直鎖である。また、タンパク質は、本発明の意味においてペプチドである。それらは通常少なくとも50アミノ酸の長さであり、複数のポリペプチド鎖を含み得る。ほとんどの場合、ペプチドは上述したように直鎖状であるが、場合によっては分岐または架橋することもある。そのようなペプチドもまた、本発明の文脈において「ペプチド」という用語に包含される。

【0023】

ラテラルフローアッセイ装置の典型的な構成を図1に示す。装置は、サンプルパッド（11）、コンジュゲートパッド（12）、吸収パッド（13）および反応膜（20）が取り付けられている固体支持体を備える。固体支持体（「バックギンカード（backing card）」）は、実際のアッセイのパッドおよび膜を支持するが、それ以外の場合は、サンプルと分析物との反応または流れには関与しない。バックギンカードは、例えばポリ塩化ビニル（PVC）で構成される。バックギンカード上のパッドおよび膜のアセンブリは、必須ではないが、通常はプラスチック製のハウジング内にある。ハウジングは、通常、サンプ

10

20

30

40

50

ルを適用するためにサンプルパッド上に少なくとも1つの開口部（「サンプルポート」）を備える。対照ラインおよび試験ラインを可視化（例えば、開口部または窓を介して）して、結合された標識を検出または測定する。ハウジングは、使用者がサンプルパッド以外の場所にサンプルを適用するのを防ぐ。ハウジングはまた、膜への不注意な飛沫からストリップを保護するのに役立つ。ハウジングの外部ラベルを使用して、試験ラインおよび対照ラインの位置を示し、その他の情報を提供することもできる。ハウジングは、既製のカセットとして入手することもでき、ストリップの周りに合うようにカスタム設計することもできる。これらの選択肢を決定するには、ユニットコスト、設計コスト、ストリップとサイズの互換性、および外部ラベルの要求のバランスを取る必要がある。内部のピンおよびバーを使用して、サンプルポートおよび表示窓に対してストリップを所定の位置に保持することができる。それらは、試験ストリップが実行されている間、材料を互いに密接に接触させる。

【0024】

パッドに使用される材料としては、多孔質マトリックスが挙げられる。最も一般的には、綿糸くず（cotton linter）等のセルロース系材料（すなわち、濾紙）がパッドに使用される。ガラス繊維フィルターも使用できるが、最も一般的にはコンジュゲートパッドに使用される。

【0025】

「サンプルパッド」は、適用時にサンプルを受容し、コンジュゲートパッドへのサンプルの均一な分散を促進する。また、液体がコンジュゲートパッドに入る速度に影響を及ぼし、装置があふれるのを防ぐことができる。さらに、サンプルパッドは、サンプルを処理（例えば、血液サンプルの場合のサンプル成分の分離、干渉の除去、pHの調整、粘度の増大、成分の可溶化、および／またはコンジュゲートと分析物または他の成分との間の非特異的結合の防止、または反応膜への非特異的結合の防止）するために、タンパク質、界面活性剤、増粘剤および緩衝塩等の追加の成分を含み得る。

【0026】

「コンジュゲートパッド」は、粒子と標的ペプチドとの乾燥した可動性コンジュゲートを含む。サンプルがコンジュゲートパッドに流入すると、コンジュゲートはパッド材料を持ち上げ、サンプルの前部とともに反応膜に移動する。したがって、サンプルパッドは、コンジュゲート（粒子-標的ペプチド）を、すべての試験ストリップにおいて一定量のサンプルを反応膜に送達する。該当する場合、コンジュゲートパッドは、乾燥した可動性の対照コンジュゲートも含む。

【0027】

本発明の装置は「吸収パッド」を有する。吸収パッドは試験ストリップの遠位端部に配置され、残りのサンプルを保持する。吸収パッドは、膜を介して液体を吸い上げ、処理された液体を収集する。さらに、吸収パッドは、試験ストリップに入るサンプルの総量を増加させる。

【0028】

「反応膜」は、試験ラインおよび対照ラインにおいて捕捉試薬に不可逆的に結合する。通常、反応膜は、ニトロセルロース、ポリフッ化ビニリデン、ナイロンまたはポリエーテルスルホン等のポリマーから構成される。ニトロセルロースは、反応膜に最適な選択肢である。ニトロセルロース膜は、硝酸エステルの強力な双極子とタンパク質内のペプチド結合の強力な双極子との相互作用を介して、タンパク質（抗体またはビオチン結合タンパク質等）に静電的に結合する。

【0029】

上記パッド、特に反応膜は、被覆テープで保護することができる。被覆テープは、少なくとも試験ラインおよび対照ラインの領域で透明でなければならない。

【0030】

本明細書における「捕捉試薬」（本明細書において「生体認識分子」とも呼ばれる）は、標的ペプチド、または対照領域の場合は対照ペプチドを特異的に認識することができる

10

20

30

40

50

分子を指す。最も一般的には、補足試薬は抗体、またはF a bフラグメント等のその抗原結合フラグメントである。抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。

【0031】

「第1の捕捉試薬」は、(サンプル中に遊離している(すなわち、非標識分析物)か、粒子に結合している(すなわち、「標識」競合標的ペプチド)かに関係なく)標的ペプチドに特異的である。任意の「第2の捕捉試薬」は、対照コンジュゲート(ペプチド、例えば、B S A等のビオチン化対照ペプチドに対する捕捉分子としてのニュートラアビジン)に結合し、すなわちポジティブ対照である。

【0032】

本明細書における「分析物」という用語は、サンプル中の検出または測定される標的分子を指す。分析物は、タンパク質または短いオリゴペプチド等のペプチドである。ペプチドは、第1の捕捉試薬によって特異的に結合することができる少なくとも1つのエピートプを有する。

【0033】

「サンプル」は、生物学的サンプル、環境サンプルまたは食品サンプル等であり得る。尿、全血、唾液、汗、血漿または血清のような体液等の生物学的サンプルが最も一般的なサンプルである。ここでは、尿が典型的なサンプルである。血液サンプルの場合、装置は、血清または血漿から血球を分離するためのフィルターマトリックスを含み得る。

【0034】

サンプルは、サンプルパッドに適用する前に希釈バッファーで希釈されてもよい。典型的な希釈は1:2(サンプル:希釈バッファー)である。典型的な希釈バッファーは、例えば、リン酸緩衝生理食塩水(P B S)、B S A、および/またはT r i t o n(商標)X-100等の非イオン性界面活性剤を含み得る。

【0035】

本発明におけるコンジュゲートの「粒子」は、競合する標的ペプチドの検出可能な標識(例えば、着色標識)として機能する。特に、粒子は、金コロイドナノ粒子、着色ラテックスビーズ、磁性粒子、炭素ナノ粒子、セレンナノ粒子、銀ナノ粒子および量子ドットからなる群から選択される。金コロイドナノ粒子は、本発明の文脈において特に好適である。そのような金ナノ粒子は、例えば、米国ミズーリ州セントルイスのS i g m a - A l d r i c h社から市販されている。

【0036】

典型的には、本発明の文脈における粒子は、実質的に球形であり、10~100nm、有利には20~60nm、最も有利には40nmの直径を有する。直径40nmの金ナノ粒子が最も有利である。

【0037】

本発明の文脈において「ビオチン結合タンパク質」は、アビジン、ストレプトアビジンおよび脱グリコシル化アビジンからなる群から選択され得る。脱グリコシル化アビジンはニュートラアビジンとして知られており、本発明において最も好適なビオチン結合タンパク質もある。これらのビオチン結合タンパク質は、例えば、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c社から市販されている。

【0038】

金粒子等の粒子にコンジュゲートさせる標的ペプチドおよび対照ペプチドは、市販されている(例えば、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c社から)標準的なビオチン化試薬(例えば、ビオチンn-ヒドロキシスクシンイミドエステル(ビオチン-N H S))を使用してビオチン化することができる。

【0039】

標的ペプチドコンジュゲートの生成中、金ナノ粒子等の粒子とビオチン結合タンパク質とが完全にコンジュゲートされ、すなわち、粒子の表面がビオチン結合タンパク質で飽和される。ウシ血清アルブミン(B S A)を、非特異的な相互作用をブロックするために添

10

20

30

40

50

加され得る。したがって、粒子は、その表面にウシ血清アルブミン（BSA）をさらに含み得る。ニュートラアビジン等のビオチン結合タンパク質は、通常、4つのビオチン分子に結合することができる。この能力を使用して、ビオチン化された標的ペプチドを粒子に間接的にコンジュゲートさせ、粒子への標的ペプチドの充填（すなわち被覆）を調整することができる。ビオチン化標的ペプチドを粒子とビオチン結合タンパク質との複合体に添加した後、任意に遊離ビオチンを溶液に添加して、ビオチン結合タンパク質の遊離ビオチン結合部位を飽和させることができる。

【0040】

本発明者らは、ビオチン化標的ペプチドの粒子への最大以下の充填（被覆）により、感度およびダイナミックレンジに関して最良の結果がもたらされることを見出した。したがって、本明細書において、標的ペプチドによる粒子への充填（被覆）は、粒子の最大充填（被覆）容量の約20%～約55%、典型的には粒子の最大充填（被覆）容量の約25%～約50%、より典型的には粒子の最大充填（被覆）容量の約25%～約45%、さらにより典型的には粒子の最大充填（被覆）容量の約25%～約40%、より好適には粒子の最大充填（被覆）容量の約25%～約35%、最も好適には粒子の最大充填（被覆）容量の約30%である。通常、ニュートラアビジン等のビオチン結合タンパク質は最大4つのビオチン分子に結合できるため、絶対数で表した標的ペプチドの粒子への充填は、上記のパーセンテージに基づいて計算することができる。例えば、40nmの金ナノ粒子OD1（526nm）の1ml溶液は、その表面において約 4.17×10^{-11} molのニュートラアビジンの最大結合容量を有する。これは、40nmの金粒子溶液1mlあたり約 1.67×10^{-10} molのビオチン（またはビオチン化標的ペプチド）に相当する。したがって、例えばビオチン化標的ペプチドを30%充填すると、40nmの金粒子溶液（526nmにおけるOD1）1mlあたり約 5.2×10^{-11} molのビオチン化標的ペプチドに相当する。

【0041】

標的コンジュゲートおよび任意に対照コンジュゲート等の試薬、ならびに捕捉分子は、例えば、好適な分配プラットフォームを使用することにより、パッドまたは反応膜に分配することができる。例えば、コンジュゲートはコンジュゲートパッドに噴霧することができ、次いでパッドを乾燥させて、コンジュゲートパッド上で、乾燥した可動性のコンジュゲートがもたらされる。

【0042】

本発明はまた、液体サンプル中の標的ペプチドを検出するための方法であって、

(a) 本発明の装置のサンプルパッドに前記液体サンプルを適用して、前記サンプルパッドからコンジュゲートパッドを介して反応膜へのサンプルの流れを可能にする工程、

(b) 捕捉領域においてコンジュゲートの存在または量を検出する工程、および

(c) 任意に、対照領域において対照コンジュゲートの存在または量を検出する工程を含み、

前記捕捉領域におけるコンジュゲートの存在もしくは不存在または検出量が、それぞれ前記液体サンプル中の標的ペプチドの不存在もしくは存在または量を示す前記方法に関する。

【0043】

この方法は、サンプル中の標的ペプチドの定量に特に有用である。

【0044】

したがって、本発明の方法を実施する場合、および／または標的ペプチドを検出または定量するために本発明の装置を使用する場合、サンプル（または場合によっては希釈サンプル）をサンプルパッド（例えば、ハウジングを使用する場合にはサンプルポート）に適用する。次に、サンプルはコンジュゲートパッドを介して反応膜に輸送される。コンジュゲートパッド上で、コンジュゲートは可溶化され、反応膜に輸送される。試験ラインの強度は、元のサンプル中の分析対象物（すなわち、標的ペプチド）の濃度に依存する。サンプル中の濃度が低いほど、コンジュゲートした標的ペプチドとサンプル中の標的ペプチド

との間の競合により、強度が強くなる。添付の図2は、このアッセイを示す。

【0045】

試験ライン（および場合によっては対照ライン）における強度は、例えば、ドイツのベルリンの opTricon GmbH から市販されている適切なリーダーを使用して検出することができる。本発明の装置は、例えば、特定の形状および寸法を有することによって、特定のリーダーに適合し得る。

【0046】

さらに、本発明は、本発明の装置を含む、液体サンプル中の標的ペプチドを検出するためのキットに関する。キットは、装置に適用する前にサンプルを希釈するための希釈バッファおよび／またはサンプルまたは希釈サンプルをサンプルパッドに適用するためのピペットを含む1つ以上の容器をさらに含み得る。キットには、使用説明書も含まれ得る。

【0047】

本発明の装置または本発明のキットは、液体サンプル中の標的ペプチドの定量化に使用することができる。標的ペプチドの性質に応じて、装置およびキットは、疾患または健康状態の診断または予後診断に使用することができる。例えば、特定の疾患、健康状態または予後を示すバイオマーカー（例えば、ペプチドホルモン、マーカータンパク質）は、本発明の文脈において決定することができる。特に、本発明の装置、キットおよび方法は、対象の診断、予後診断、リスク評価、リスク層別化、モニタリングおよび／または治療管理のために使用することができる。本明細書において「対象」という用語は、生きているヒト、または哺乳動物等の非ヒト動物を指し、特にヒトを指す。対象は、最も好適には患者である。本明細書において使用される「患者」という用語は、医療を受けている、または疾患もしくは病状のために医療を受けるべき生きているヒトまたは非ヒト動物（通常はヒト）を指す。これには、病状の兆候について検査されている、明確な病気のない人が含まれる。したがって、本明細書に記載の方法およびアッセイは、ヒトおよび家畜の両方の疾患に適用可能である。

【0048】

本発明の文脈における「診断」は、対象における疾患または臨床状態の認知および（早期の）検出に関連し、鑑別診断も包含し得る。また、特定の実施形態において、疾患または臨床状態の重症度の評価は「診断」という用語に包含され得る。

【0049】

「予後診断」は、特定の疾患または臨床状態に罹患している対象について転帰（outcome）または特定のリスクの予測に関する。これには、当該対象についての回復の可能性または有害な結果の可能性の推定が包含され得る。

【0050】

「モニタリング」または「治療モニタリング」は、例えば、疾患の進行または疾患や障害の進行に対する特定の治療の影響を分析するために、すでに診断された疾患、障害、合併症またはリスクを追跡することに関する。本発明において、「リスク層別化」という用語は、対象のさらなる予後診断に従って、対象を異なるリスク群にグループ化することに関する。リスク層別化は、予防的および／または治療的手段を適用するための層別化にも関する。

【0051】

本発明の文脈において「患者管理」という用語は：

- ・病院または集中治療室への入院の決定、
- ・患者を専門病院または専門病院ユニットに移す決定、
- ・集中治療室または病院からの早期退院の評価、および／または
- ・リソースの割り当て（例えば、医師および／または看護スタッフ、診断、治療、手術）

を指す。

【0052】

「疾患の重症度の評価」という用語は、疾患の進行、有害事象の可能性、高い入院費用

10

20

30

40

50

の可能性、および長期の入院またはリハビリテーションの可能性を含む、患者の疾患の状態の評価に関する。

【0053】

したがって、一つの態様において、本発明は、疾患または健康状態を診断または予後診断する方法であって、

(a) 本発明の装置のサンプルパッドに液体サンプルを適用して、前記サンプルパッドからコンジュゲートパッドを介して反応膜へのサンプルの流れを可能にする工程、

(b) 捕捉領域においてコンジュゲートの存在または量を検出する工程、および

(c) 任意に、対照領域において対照コンジュゲートの存在または量を検出する工程を含み、

前記捕捉領域におけるコンジュゲートの存在もしくは不存在または検出量が、それぞれ前記液体サンプル中の標的ペプチドの不存在もしくは存在または量を示し、

前記液体サンプル中の標的ペプチドの不存在もしくは存在または量が、前記疾患または健康状態の診断または予後診断の指標とされる前記方法に関する。

【0054】

変形性関節症における破壊を測定するために現在利用可能な検査の限界を考慮すると（例えば、関節腔狭小化のX線写真による評価は軟骨喪失の間接的な指標に過ぎない）、軟骨劣化の生物学的マーカーは非常に高く評価される。例えば、標的ペプチドは、軟骨劣化のマーカーであり、変形性関節症（OA）および関節リウマチ（RA）等の関節疾患、特にOAの診断のためのマーカーであるC末端架橋テロペプチドI I型コラーゲン（CTX-I I）であり得る。

【0055】

I I型コラーゲンは軟骨の主要なコラーゲンであり、軟骨細胞と滑膜細胞によって分泌されるタンパク質分解酵素によって分解される。これらの酵素の作用から放出されたCTX-I Iペプチドは、尿から排出される。したがって、尿のCTX-I Iは、変形性関節症または関節リウマチに罹患している対象にとって、初期の軟骨劣化の生化学的感受性マーカーである（Garnero et al., 2000; loc. cit.）。

【0056】

したがって、本発明の装置は、対象（典型的には、変形性関節症、特に膝または股関節の変形性関節症、より具体的には膝の変形性膝関節症に罹患している患者）の軟骨劣化を検出するために使用され得、軟骨疾患の存在または程度に応じて特定の薬を用いて対象を治療することを決定し得る。

【0057】

軟骨の劣化に関連する疾患、特に変形性関節症（例えば、膝または股関節の変形性関節症、典型的には膝の変形性関節症）の治療、特に変形性関節症に関連する疼痛の治療に好適な薬剤は、ヒアルロン酸（ヒアルロナン（HA）とも呼ばれる）、またはヒアルロン酸ナトリウム等のその薬学的に許容可能な塩または誘導体を含む関節内補充薬（viscosupplement）である。HAは、例えば架橋によって頻繁に改変される。HAベースの関節内補充薬は、通常、関節内に投与され、例えば、膝関節の関節内空間に注入される。特定のヒアルロナンは、Synvisc（登録商標）およびSynvisc-One（登録商標）（サノフィ社）等の製品に含まれる「hy lan G-F20」である。そのような関節内補充薬および対応する投薬量および投与スキームは、例えば、US7,931,030およびWO2006/073835A2に記載されている。

【0058】

HAは、動物起源、例えば、雄鶏の冠または臍帯に由来するもの、または非動物起源、例えば、細菌発酵したものであり得る。細菌発酵されたHAは、例えば、Cooney et al. (1999) Biotechnol. Prog., 15:898-910に記載されているように製造することができる。細菌発酵したHAも市販されている（例えば、資生堂、日本；Sigma-Aldrich、米国）。上記のように、HAは、誘導体化されていてもよく（例えば、架橋されているか、そうでなければ修飾または安定化されている）、または誘導体化されていなくても

よい。架橋剤の例としては、アルデヒド、エポキシド、ポリアジリル、グリシジルエーテル（例えば、1, 4-ブタンジオールジグリシジルエーテル）およびジビニルスルホンが挙げられる。

【0059】

したがって、本発明の文脈において「ヒアルロン酸」、「ヒアルロナン」および「HA」という用語は、ヒアルロン酸の薬学的に許容可能な塩または誘導体、特に「ヒランG-F20」、より具体的には製品Synvisc（登録商標）およびSynvisc-One（登録商標）（サノフィ社）を包含する。

【0060】

したがって、本発明はまた、対象における軟骨疾患、特に変形性関節症、より具体的には股関節または膝の変形性関節症、特に膝の変形性関節症に関連する疼痛を治療する方法（すなわち、軟骨疾患に関連する疼痛を緩和する方法）に関し、本発明の装置を使用して前記対象の尿サンプル中のCTX-IIの濃度を決定することを含み、尿サンプル中のCTX-IIの濃度に応じて患者がヒランG-F20等のヒアルロン酸、例えばSynvisc（登録商標）またはSynvisc-One（登録商標）で治療され、またはそうではなく、前記サンプル中のCTX-IIの濃度に基づいてヒランG-F20等のヒアルロン酸、例えばSynvisc（登録商標）またはSynvisc-One（登録商標）を使用する治療レジメンが決定される。ヒランG-F20等のヒアルロン酸含有医薬品、例えばSynvisc（登録商標）またはSynvisc-One（登録商標）は通常、罹患している関節、特に膝または股関節に注射される。同様に、本発明は、対象における軟骨疾患、特に変形性関節症、より具体的には股関節または膝の変形性関節症、特に膝の変形性関節症に関連する疼痛の治療において使用するためのヒランG-F20等のヒアルロン酸、例えばSynvisc（登録商標）またはSynvisc-One（登録商標）に関し、本発明の装置を使用して前記対象の尿サンプル中のCTX-IIの濃度が決定され、前記尿サンプル中のCTX-IIの濃度に応じて患者がヒランG-F20等のヒアルロン酸、例えばSynvisc（登録商標）またはSynvisc-One（登録商標）で治療され、またはそうでなく、前記サンプル中のCTX-IIの濃度に基づいてヒランG-F20等のヒアルロン酸、例えばSynvisc（登録商標）またはSynvisc-One（登録商標）を使用する治療レジメンが決定される。

【0061】

したがって、本発明の疾患または健康状態を診断または予後診断する方法の文脈において、前記方法は、

(d) 所定の閾値を超えるCTX-IIの存在がサンプル中に検出された場合、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容可能な塩もしくは誘導体、例えばヒランG-F20を含む関節内補充薬を前記対象に処方する工程をさらに含んでもよい。

【0062】

また、本発明の疾患または健康状態を診断または予後診断する方法の文脈において、前記方法は、

(d) 所定の閾値を超えるCTX-IIの存在がサンプル中に検出された場合、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容可能な塩もしくは誘導体、例えばヒランG-F20を含む関節内補充薬を前記対象に投与する工程をさらに含んでもよい。

【0063】

したがって、本発明はさらに、対象における変形性関節症等の軟骨疾患に関連する疼痛の治療における使用のための、ヒアルロン酸、またはヒランG-F20等のその薬学的に許容可能な塩もしくは誘導体を含む関節内補充薬であって、前記対象の尿サンプル中のCTX-IIの濃度が本発明のラテラルフローアッセイ装置を使用して測定され、前記尿サンプル中のCTX-IIの濃度に応じて、関節内補充薬が前記対象に投与される前記関節内補充薬に関する。

【0064】

換言すれば、本発明はさらに、対象における変形性関節症等の軟骨疾患に関連する疼痛の治療における使用のための、ヒアルロン酸、またはヒランG-F20等のその薬学的に許容可能な塩もしくは誘導体含む医薬組成物であって、前記対象の尿中のCTX-IIの濃度が本発明のラテラルフローアッセイ装置を使用して測定され、前記尿サンプル中のCTX-IIの濃度に応じて、医薬組成物が前記対象に投与される前記医薬組成物に関する。

【0065】

結果として、また、本明細書において既に説明したように、本発明はまた、対象における変形性関節症等の軟骨疾患に関連する疼痛を治療する方法であって、本発明のラテラルフローアッセイ装置により所定の閾値を超えるCTX-IIの存在が前記対象のサンプル中、特に尿サンプル中に検出された場合、前記対象にヒアルロン酸、またはヒランG-F20（例えば、Synvisc（登録商標）またはSynvisc-One（登録商標））等のその薬学的に許容可能な塩もしくは誘導体を含む関節内補充薬を投与することを含む前記方法に関する。

10

【0066】

一つの態様において、本発明は、尿サンプル中のCTX-IIを検出するためのラテラルアッセイ装置であって：

（a）固体支持体、

（b）前記固体支持体の第1の端部でサンプルを最初に受容し、任意に前処理するためのサンプルパッド、

20

（c）前記固体支持体の第2の端部の吸収パッド、

（d）乾燥状態で粒子（特に金ナノ粒子）とCTX-IIとの可動性コンジュゲートを含むコンジュゲートパッドであって、前記粒子にコンジュゲートされたCTX-IIがビオチン化され、該粒子がその表面にビオチン結合タンパク質（特にニュートラアビジン）を含む前記コンジュゲートパッド、

（e）以下を含む反応膜

（i）標的ペプチドに対する固定化された第1の捕捉試薬（特に抗体）を含む捕捉領域、および

（ii）任意に、対照コンジュゲート（特にビオチン化BSA）に対する固定化された第2の捕捉試薬（特にニュートラアビジン）を含む対照領域を含み、

30

前記サンプルパッド、コンジュゲートパッド、反応膜および吸収パッドが前記固体支持体に取り付けられて、前記サンプルパッドから前記コンジュゲートパッドを介した前記反応膜への毛細管流動を可能にする前記装置に関する。

【0067】

本明細書において、CTX-IIの粒子（特に金ナノ粒子）への充填（被覆）は、粒子の最大充填（被覆）容量の約20%～約55%、典型的には粒子の最大充填（被覆）容量の約25%～約50%、より典型的には粒子の最大充填（被覆）容量の約25%～約45%、さらにより典型的には粒子の最大充填（被覆）容量の約25%～約40%、より好適には粒子の最大充填（被覆）容量の約25%～約35%、最も好適には粒子の最大充填（被覆）容量の約30%である。

40

【0068】

CTX-IIに対するポリクローナル抗体は、ウサギ等の動物を免疫することで產生することができる。次いで、例えばアフィニティークロマトグラフィーを使用して、例えば前記動物の血清から抗体を精製することができる。モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を產生するための方法は、当技術分野でよく知られている。

【0069】

尿中のクレアチニンは（腎疾患がない場合）個体において比較的一定であるため、尿サンプル中の標的ペプチドの濃度を決定する場合、キャリブレーター（calibrator）として

50

尿中クレアチニン濃度がさらに決定されてもよい。この目的のために、装置はさらに、クレアチニンを測定するための比色分析または蛍光分析のための反応領域（「クレアチニン反応領域」）を含んでいてもよい。サンプル（または場合によっては希釈サンプル）の一部をクレアチニンアッセイに追加して、クレアチニン濃度を測定することができる。特に、これは、本発明によるCTX-I Iの検出のための装置および方法に適用される。

【0070】

クレアチニンアッセイは、例えば、本発明のラテラルフロー免疫アッセイと並行して装置内に配置されるストリップ形態のラテラルフローアッセイであり得る。したがって、クレアチニンアッセイは、サンプルパッドおよび反応領域（ラテラルフロー免疫アッセイの反応膜と同様）を含んでいてもよい。

10

【0071】

クレアチニンアッセイは、通常、「乾式化学」試験であり、すなわち、当該アッセイは、例えば、追加のサンプルパッドで乾燥された乾燥状態の可動性指示薬色素（または色素組成物）を含む。クレアチニンを検出するための典型的な色素組成物は、酸化可能な色素（キノリン等）、 Cu^{2+} イオンおよびヒドロキシペルオキシドを含む。クレアチニンがサンプル中に存在する場合、第二銅イオンとクレアチニンとの間で複合体が形成される。この Cu^{2+} -クレアチニン複合体は、ヒドロキシペルオキシドの存在下で色素、特にキノリンを酸化する。前記色素の酸化は、リーダーを使用して検出することができる色の変化をもたらす。クレアチニンを検出するための好適なアッセイは、例えば、US 5, 374, 561およびUS 6, 001, 656に記載されている。

20

【実施例】

【0072】

実施例1：CTX-I I-ニュートラアビジン-金コンジュゲートの生成

すべてのインキュベーション工程（カップリング、ブロックング、飽和等）は、室温においてタンブラーシェーカーにおいて行った。

【0073】

工程1-ニュートラアビジン-金コンジュゲート：

1 mlの40 nm金コロイドOD_{526nm}1溶液当たり7.5 μg のニュートラアビジンを、5 mMのホウ酸ナトリウム緩衝液中で2時間カップリングした。次いで、溶液を1% BSAで30分間ブロックングした。遠心分離（1% BSAによる洗浄工程を含む）をした後、コンジュゲートペレットを1% BSAを含む2 mMホウ酸緩衝液に再懸濁し、0.22 μm でろ過した。結果物はニュートラアビジン-金コンジュゲートであった。ニュートラアビジン-金コンジュゲートには、金粒子1 ml当たり2.5 μg のニュートラアビジンが充填されていると想定される。ニュートラアビジンの分子量（60000 g/mol）を考慮すると、これは、金溶液1 ml当たり 4.17×10^{-11} molのニュートラアビジンのモル充填に相当する。1つのニュートラアビジン分子にはビオチンの結合部位が4つあるため、理論的には1 mlの溶液当たり 1.67×10^{-10} molのビオチン分子（および結果としてCTX-I I等の標的ペプチド）がニュートラアビジン-金コンジュゲートに結合することができる。これは、本明細書で言うところの100%の充填に相当する。

30

40

【0074】

過剰な金が作用するように7.5 μg の金をカップリングに使用し、再現性のある充填を得た。

【0075】

工程2-CTX-I I-ニュートラアビジン-金コンジュゲート：

ニュートラアビジン-金コンジュゲートOD_{526nm}1溶液当たり 5.2×10^{-11} molのビオチン化CTX-I Iを、1% BSAを含む2 mMホウ酸緩衝液中で1時間カップリングした。次いで、フリーの（free）ビオチン結合部位を1 mlのニュートラアビジン-金コンジュゲートOD_{526nm}1当たり 2.5×10^{-4} molのビオチンで1時間飽和させた。遠心分離後、コンジュゲートペレットを再懸濁緩衝液に再懸濁し、0

50

． 22 μm でろ過した。結果物はCTX-I I-ニュートラアビジン-金コンジュゲートであった。

【0076】

1 mlのニュートラアビジンコンジュゲートOD_{526nm}1は、理論的には 1.67×10^{-10} molのビオチンと結合することができる。CTX-I I抗原は、1 molのCTX-I Iが1 molのビオチンに結合するように合成的にビオチン化された。したがって、理論的には、 1.67×10^{-10} molのビオチン化CTX-I Iが1 mlのニュートラアビジン-金コンジュゲートに結合した。これは、本明細書で言うところの100%の充填に相当する。 5.2×10^{-11} molのビオチン化CTX-I Iを1 mlのニュートラアビジン-金-コンジュゲートに添加するだけで、結合部位の約30%のみが占有され；したがって、これは30%の充填と呼ばれる。この場合、結合部位の残りの70%は、過剰に添加されたビオチンで飽和される。

10

【0077】

実施例2：CTX-I I免疫アッセイ

アッセイの原理

CTX-I Iラテラルフロー装置(LFD)は、以下の構成要素を備えた競合免疫アッセイ(図1および2を参照されたい)である：

ーサンプル：分析物としてCTX-I Iを含むヒト尿(Triton(商標) X-100を含むPBSで1：2に希釈)；

ーコンジュゲートパッド：金コロイドナノ粒子とCTX-I Iとのコンジュゲート、および金コロイドナノ粒子とビオチン化BSAとの対照コンジュゲート

20

ー試験ライン：抗CTX-I I抗体。

【0078】

サンプル中のCTX-I Iおよび金-CTX-I Iコンジュゲートは、試験ライン(抗CTX-I I抗体)への結合をめぐって競合する。金コンジュゲートが試験ラインに結合すると、試験ラインは赤く表示される(サンプル中のCTX-I I濃度が比較的低い場合)。金粒子は色付きの標識として機能する。サンプル中に含まれるCTX-I Iが多いほど、試験ラインの強度は低くなる。試験ラインの色の強度は、リーダーを使用して読み取られ、予め記録された検量線を使用して濃度に変換される。対照ライン(ポジティブ対照)は、試験の検証に使用される。

30

【0079】

金ナノ粒子は、再現性と安定性を確保するために、ニュートラアビジン(および非特異的相互作用をブロックするためのBSA)と完全に結合している。ニュートラアビジンは4つのビオチン分子に結合することができる。この機能は、ビオチン化CTX-I Iと金ナノ粒子とを間接的にコンジュゲートさせ、金ナノ粒子へのCTX-I Iの充填を調整するために使用される(図3を参照されたい)。

【0080】

材料および方法

金-CTX-I Iコンジュゲートを下記の通り構築した：40 nmの金粒子とニュートラアビジン(OD1金ナノ粒子懸濁液(Sigma-Aldrich社またはBBioso-
lutions社)1 ml当たり5 μg のニュートラアビジン)とをコンジュゲートし、次いで、ウシ血清アルブミン(BSA)でブロッキングした(OD：光学密度(OD1=光学密度1))。次いで、コンジュゲートしたニュートラアビジンにビオチン化CTX-I Iを充填した。CTX-I Iとインキュベーションした後、遊離ビオチンを溶液に添加してニュートラアビジンのフリーのビオチン結合部位を飽和させた。

40

【0081】

充填したCTX-I Iの量を計算するために、2.5 μg のニュートラアビジンが1 mlの金粒子懸濁液に実際に結合し、1 molのニュートラアビジンが4 molのビオチンに結合すると仮定した。

【0082】

50

結果（図 4 および 5 も参照されたい）：

- a) 100%の充填の場合（コンジュゲートのために過剰なCTX-I I）：
- －サンプル中CTX-I I濃度0 $\mu\text{g}/\text{l}$ では試験ラインの強度が低かった
 - －サンプル中CTX-I I濃度10 $\mu\text{g}/\text{l}$ では試験ラインの強度に視覚的に認識できる低下はなかった（競合は100 $\mu\text{g}/\text{l}$ のCTX-I Iでのみ視覚的に認識可能であった）
 - －したがって、感度を上げるためにCTX-I Iの充填を減らす必要があった。
- b) 50%の充填の場合：
- －100%の充填と同様の感度であるが、0 $\mu\text{g}/\text{l}$ のCTX-I Iでの試験ラインはより強度が高かった
- c) 30%の充填の場合：
- －0 $\mu\text{g}/\text{l}$ のCTX-I Iで試験ラインの強度が高かった
 - －10 $\mu\text{g}/\text{l}$ のCTX-I Iで試験ライン強度に視覚的に認識できる低下がみられた
- d) 10%の充填の場合：
- －試験ラインの強度が高かった；サンプル中のCTX-I Iによる強度の視覚的に認識できる低下はなかった

10

【0083】

結論：

間接的なカップリング（例えば、ニュートラアビジンを介した）は、一般に、CTX-I Iの粒子への充填の調整を可能にして、アッセイを最適化し、特に、この場合、充填を最適な30%の充填に低下させることができる。この充填では、試験ラインの染色はサンプル中の低CTX-I I濃度で顕著であり、高CTX-I I濃度で低かった。目視検査（図 4）はリーダーを使用して確認された（図 5）。そのような最適化は、従来技術の方法を使用して不可能である広い濃度範囲にわたって高感度を可能にするものである。

20

【0084】

100%の充填では、CTX-I I濃度が低い場合でも試験ラインの強度が非常に弱く、信号強度がリーダーの線形範囲外になるように、アッセイ全体のコンジュゲート濃度を下げる必要がある。

【0085】

逆の構成（すなわち、非競合アッセイ；金ナノ粒子とコンジュゲートした抗CTX-I I抗体、試験ラインにおけるCTX-I I）も試験された。しかしながら、100%の充填が必要なため、感度が不十分であった。さらに、この逆の構成は、競合アッセイの構成よりも高価であった。

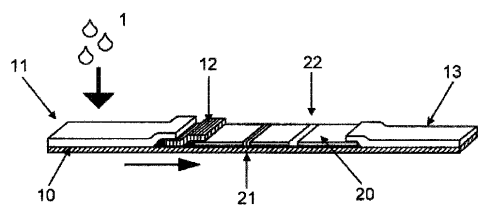
30

【0086】

本明細書で引用された文書は、その全体が参照により組み込まれる。

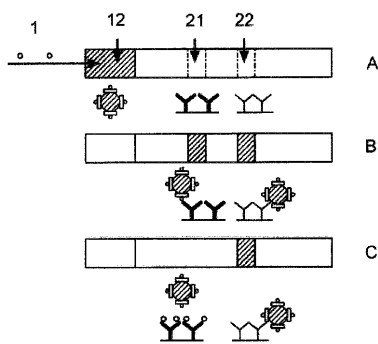
【 図 1 】

Figure 1

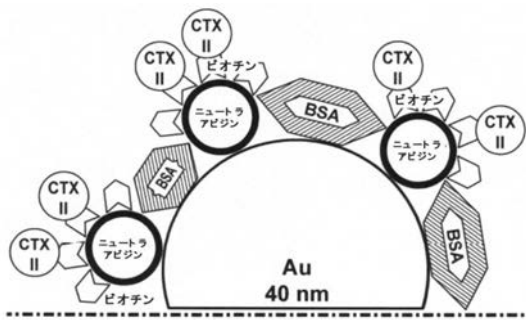


【 図 2 】

Figure 2



【 図 3 】

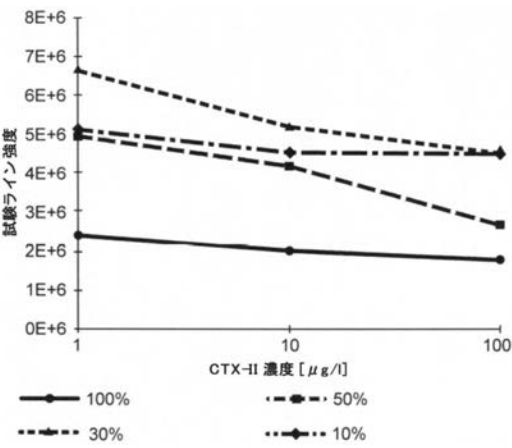


【 図 4 】

Figure 4

	CTX-II $\mu\text{g/l}$		
	1	10	100
100%			
50%			
30%			
10%			

【 図 5 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/058224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/543
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 106 370 844 A (LYU WEIFENG) 1 February 2017 (2017-02-01) see Fig. 1, [0014, 0022, 0029, 0037-0040] -----	1-19
Y	US 2008/138842 A1 (BOEHRINGER HANS [US] ET AL) 12 June 2008 (2008-06-12) see Fig. 1, [0006-0015, 0020-0024, 0035, 0038-0039, 0046, 0049-0050, 0062, 0088, 0111, 0126], claims -----	1-19
Y	CN 107 688 090 A (RUNBIO BIOTECH CO LTD) 13 February 2018 (2018-02-13) see Figs. 1-3, [0001, 0014, 0018-0025, 0041] ----- -/--	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 April 2019

Date of mailing of the international search report

18/04/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diez Schlereth, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/058224

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KYOUNG LEE ET AL: "Measurement of Urinary N-Telopeptides and Serum C-Telopeptides from Type I Collagen Using a Lateral Flow-Based Immunoassay", SENSORS, vol. 13, no. 1, 24 December 2012 (2012-12-24), pages 165-174, XP055381561, DOI: 10.3390/s130100165 see Fig. 2, p. 166-170 -----	1-20
Y	US 2005/196875 A1 (BLATT JOEL M [US] ET AL) 8 September 2005 (2005-09-08) see Fig. 1, [0013, 0020-0021, 0043-0045, 0049-0050, 0064, 0092-0109] -----	1-19
A	Lourdes Rivas ET AL: "Lateral Flow Biosensors Based on Gold Nanoparticles" In: "Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry", 1 January 2014 (2014-01-01), Elsevier, XP055490328, ISSN: 0166-526X ISBN: 978-0-444-63285-2 vol. 66, pages 569-605, DOI: 10.1016/B978-0-444-63285-2.00014-6, the whole document -----	1-20
A	YAN GONG ET AL: "Improved LFIA for highly sensitive detection of BNP at point-of-care", INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, vol. Volume 12, 1 June 2017 (2017-06-01), pages 4455-4466, XP055501064, DOI: 10.2147/IJN.S135735 see p. 4459 -----	1-20
Y	EP 2 026 821 A1 (GOBBO SANDRA [CH]; PETRELLA ROBERT JOHN [CA]) 25 February 2009 (2009-02-25) see claims -----	20
Y	EP 3 156 801 A1 (LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN [DE]) 19 April 2017 (2017-04-19) see claims -----	20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/058224

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 106370844	A	01-02-2017	NONE	
US 2008138842	A1	12-06-2008	EP 2126569 A2	02-12-2009
			JP 2010512537 A	22-04-2010
			US 2008138842 A1	12-06-2008
			US 2012107956 A1	03-05-2012
			WO 2008073222 A2	19-06-2008
CN 107688090	A	13-02-2018	NONE	
US 2005196875	A1	08-09-2005	US 2005196875 A1	08-09-2005
			US 2010210038 A1	19-08-2010
EP 2026821	A1	25-02-2009	AR 060784 A1	10-07-2008
			AT 440609 T	15-09-2009
			BR PI0621656 A2	20-12-2011
			CA 2651039 A1	22-11-2007
			CN 101437527 A	20-05-2009
			EA 200802307 A1	28-04-2009
			EP 2026821 A1	25-02-2009
			ES 2332667 T3	10-02-2010
			JP 2009536625 A	15-10-2009
			MY 149505 A	13-09-2013
			PT 2026821 E	09-12-2009
			TW 200812597 A	16-03-2008
			US 2009163441 A1	25-06-2009
			WO 2007131546 A1	22-11-2007
EP 3156801	A1	19-04-2017	EP 3156801 A1	19-04-2017
			WO 2017064215 A1	20-04-2017

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72)発明者 イェルク－エム．ホリッド

ドイツ連邦共和国ベルリン、ダムシュミューラー、シュトラッセ、49ツェー

(72)発明者 トーマス、ボグシュ

ドイツ連邦共和国ファルケンゼー、ベートーベンアレー、81

(72)発明者 フランツィスカ、ベルナー

ドイツ連邦共和国ベルリン、ネルドゥナーシュトラッセ、8

(72)発明者 ハーディー、キーツマン

ドイツ連邦共和国フランクフルト、アム、マイン、カー703、インダストリーパーク、ヘーヒスト、サノフイーアベンティス、ドイチュラント、ゲーエムベーハー、パテント、デパートメント